



Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Agrobiologia

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Chefias da Agrobiologia

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. De Pesq e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO

Nº 84

ISSN 0104-6187

Novembro 98

Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Victor Augusto Marin

José Ivo Baldani

Seropédica – RJ

1998

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à

Embrapa..Agrobiologia

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Norma Gouvêa Rumjanek

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix
e/ou Sérgio Alexandre Lima

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

TEIXEIRA, K.R. dos S.; MARIN, V.A.; BALDANI, J.I. **Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998, 25p. (Embrapa – CNPAB. Documentos, 84).

ISSN: 0104-6187

1. Bioquímica. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Nitrogenase. I. Baldani, J.I., colab. II. Marin, V.A., colab. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 572

S U M Á R I O

1. INTRODUÇÃO	4
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN

*Kátia Regina dos Santos Teixeira*¹

*Victor Augusto Marin*²

*José Ivo Baldani*¹

1.Introdução

Desde 1975, Burnes & Hardy já haviam proposto que apesar dos microrganismos diazotróficos apresentarem um amplo espectro de habitats, sendo encontrados livremente no ambiente e até em associação simbiótica com plantas, todos utilizam uma maquinaria bioquímica básica para a fixação de N₂, a nitrogenase.

Apesar de Bortels (1932) ter observado que a fixação de nitrogênio pode ocorrer na ausência de molibdênio (Mo), até o início da década de 80, pesquisadores acreditavam que *Azotobacter vinelandii* e outros microrganismos fixadores de nitrogênio continham uma única nitrogenase, a nitrogenase dependente de Mo. Esta nitrogenase, ou nitrogenase clássica como é mais conhecida atualmente, é um complexo enzimático composto de duas metalo-proteínas, designadas Fe-proteína e MoFe-proteína, ambas requeridas para a catálise (Dean & Jacobson, 1992).

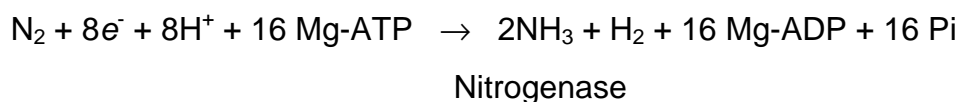
Entretanto, com os estudos conduzidos por Bishop et al. (1980) e Robson et al. (1986) foi estabelecido que sistemas alternativos da nitrogenase, eram independentes geneticamente, sendo eles: nitrogenase 1 (clássica ou dependente de Mo – codificada por genes *nif*), nitrogenase 2 (dependente de Vanádio (V) – codificada por genes *vnf*) e nitrogenase 3 (alternativa ou apenas dependente de Ferro (Fe) – codificada por genes *anf*) (Evans & Burris, 1992, Teixeira, 1997). A nitrogenase 1, descrita anteriormente, só é expressa em meio contendo Mo e é a que se encontra presente em todos os microrganismos diazotróficos estudados até o

¹ Pesquisadores EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

² Estudante de Doutorado do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal – UFRRJ/Embrapa Agrobiologia, E sob orientação de J.I. Baldani e co-orientação de K.R.S. Teixeira.

momento. A nitrogenase 2 ou dependente de V é um complexo enzimático contendo V na composição do cofator. Este cofator só é sintetizado quando V está presente em meio livre de N e na ausência de Mo. A nitrogenase 3 não contém nem Mo nem V e é induzida apenas na presença de Fe, sob condições de deficiência de Mo e V (Bishop & Premakumar, 1992; Davis et al., 1996). Estirpes com deleções nos genes estruturais (*nifHDK*) facilitaram o isolamento das nitrogenases 1, 2 e 3 de *A. vinelandii* (Bishop et al., 1986) e da nitrogenase 2 de *A. chroococcum* (Robson et al., 1986). Desde então, a existência de nitrogenases alternativas deixou de ser um dogma e já foram identificadas em diversos grupos de microrganismos diazotróficos, tais como: *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Methanosarcina barkeri* e *Clostridium pasteurianum* (citados por Zinoni et al., 1993). Apesar do interesse de diversos autores no estudo da genética e do mecanismo de regulação tanto da nitrogenase clássica quanto das nitrogenases alternativas (dependente de V ou Fe), em termos de estudos de cristalografia, a nitrogenase clássica ainda é a mais estudada.

Considerando a nitrogenase clássica com padrão, em geral, a redução do substrato pela nitrogenase envolve três tipos básicos de transferência de elétrons: i) redução da Fe-proteína por carreadores de elétrons, ii) transferência de um único elétron a partir da Fe-proteína para a MoFe-proteína através de um processo dependente de Mg-ATP (no mínimo 2 Mg-ATP/elétron transferido) e iii) transferência de elétron para o substrato ligado ao sítio ativo da MoFe-proteína. Portanto, em condições ótimas, a estequiometria da reação catalítica responsável pela redução do N₂ para formação de 2 moléculas de amônia é usualmente descrita como abaixo (Simpson & Burris, 1984):



A nitrogenase, além de catalisar a redução de N₂ a amônia, reduz prótons a hidrogênio e também pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto (Kim & Rees, 1994). Uma reação particularmente importante é a redução de acetileno a etileno, a qual é muito utilizada para se medir indiretamente a fixação de nitrogênio, técnica que além de econômica, é bastante sensível e rápida (Sprent & Sprent, 1990).

Componentes estruturais da nitrogenase

Além das proteínas estruturais, o complexo da nitrogenase requer a presença de centros metálicos, os agrupamentos 4Fe-4S (responsáveis pelo carácter redutor da Fe-proteína), os agrupamentos P e o cofator de Fe e Mo (FeMoco) que participam da transferência de elétrons e da arquitetura do sítio ativo da FeMo-proteína, respectivamente. Além disso, segundo Lowe et al. (1985), o FeMoco é certamente o sítio para a ligação e redução de N_2 .

Um grande número de sequências de aminoácidos referentes a Fe proteína, foram deduzidas a partir das correspondentes sequências de nucleotídeos do gene *nifH* de diversos organismos, entre eles: *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *C. pasteurianum*, *R. capsulatus*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, *Rhizobium* sp. (*Parasponium*), *Sinorhizobium meliloti* (nov. class. de *R. meliloti* - De Lajudie et al., 1994), *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium* ORS571, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, estirpe de *Rhizobium* ANU240, *Anabaena* 7120, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Azospirillum brasilense* Sp7, *Herbaspirillum seropedicae* Z78, *Acetobacter diazotrophicus* PAL5, *Frankia* estirpes HRN18a e Ar13, *Methanobacterium ivanovii*, *Methanococcus. voltae* e *M. thermolithotrophicus* (revisado por Dean & Jacobson, 1992; Sevilla et al., 1997, Machado et al., 1996).

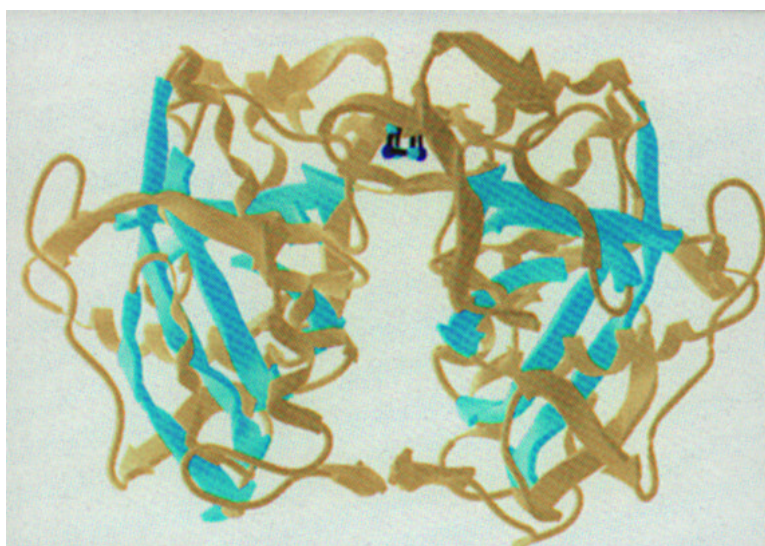


Figura 1 – Modelo da Fe-proteína derivado a partir de análises de cristalografia. Observar a presença de agrupamento 4Fe-4S na porção central entre as duas subunidades α do dímero (Prescott et al., 1993).

As Fe-proteínas são dímeros (α_2) de subunidades idênticas (homodiméricas), codificadas pelo gene *nifH*, com peso molecular variando de 57 a 72 kDa, sendo que todas contém um agrupamento 4Fe-4S por dímero. As duas subunidades α da Fe-proteína são relacionadas entre si por um eixo de simetria bilateral que atravessa o agrupamento 4Fe-4S (Figura 1). Resíduos de cisteína (Cys 97 e 132) participam da coordenação simétrica entre cada uma das subunidades da Fe-proteína e o agrupamento 4Fe-4S.

A MoFe proteína é um tetrâmero com peso molecular médio de 220 kDa, correspondente às 4 subunidades ($\alpha_2\beta_2$) organizadas de forma heterodiméricas. A subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e tem um peso molecular de 50 kDa, a subunidade β é codificada pelo gene *nifK* e tem peso molecular de 60 kDa (Eady & Smith, 1979; Kennedy et al., 1976). A MoFe-proteína geralmente apresenta alto conteúdo de metais: 24-36 Fe, 24-32 S e 1-2 Mo por mol (220 kDa), sendo que dois tipos de centros estão envolvidos na reação redox do processo de redução de N_2 : os centros P que podem se organizar como quatro agrupamentos 4Fe-4S e dois idênticos cofatores de FeMo (FeMoco), também conhecidos como centros M.

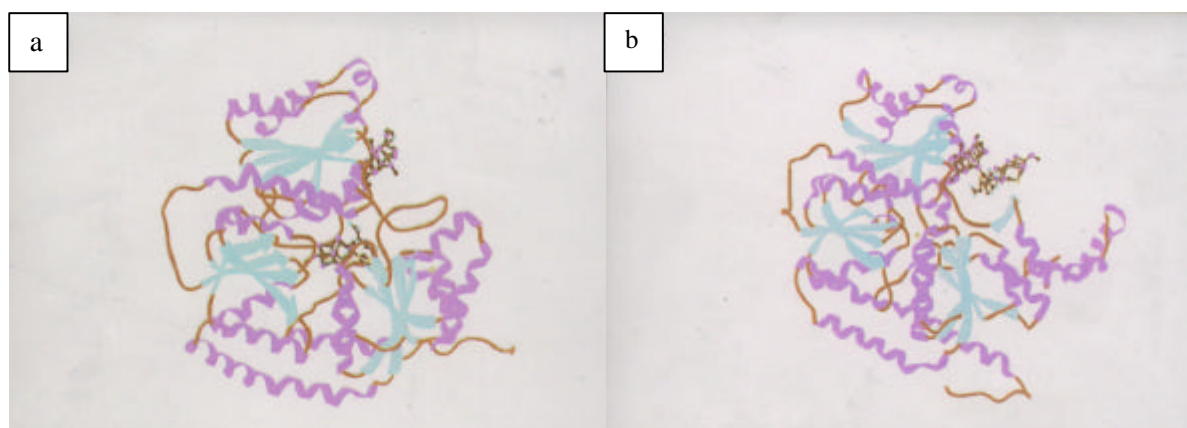


Figura 2 – Subunidades α e β da MoFe-proteína (Kim & Rees, 1994). (a) Na subunidade α estão representados o cofator de FeMo localizado na porção central e o agrupamento P na porção superior à direita do polipeptídeo. (b) Na subunidade β também pode se observar o par de agrupamento P que está localizado na superfície que faz contato com a subunidade α .

Segundo Kim & Rees (1994), a organização das subunidades α e β parece funcionar como unidade funcional da MoFe-proteína devido à presença do FeMoco

ocupando o interior de uma fenda na subunidade α , enquanto o agrupamento P está localizado na interface entre as subunidade α e β de cada par.

Várias nomenclaturas têm sido usadas para designar as proteínas que formam o complexo da nitrogenase. Por exemplo, Fe-proteína = componente II = dinitrogenase redutase e MoFe proteína = componente I = dinitrogenase. Essas diferentes nomenclaturas têm uma variedade de origens e cada nomenclatura tem relação no contexto para qual foi usada (Dean & Jacobson, 1992). As Fe e FeMo proteínas, se referem à metalo-composição dos respectivos componentes, enquanto componente I e componente II referem-se à sequência de eluição das proteínas durante a cromatografia (Bulen & Lecomte, 1966). Com base na ligação do substrato e redução, Hageman & Burris (1978), propuseram os termos dinitrogenase redutase e dinitrogenase, entretanto, é importante ressaltar que esta nomenclatura reflete o carácter funcional destes componentes apenas quando o complexo nitrogenase está formado. Porém, na nomenclatura mais utilizada atualmente, as proteínas são designadas pelas iniciais do gênero e da espécie do microrganismo, seguidos de 1 ou 2 para indicar a MoFe-proteína (componente I) ou a Fe-proteína (componente II), respectivamente. Por exemplo, Fe-proteína de *Azotobacter vinelandii* é indicada como Av2 (Dean & Jacobson, 1992).

Estrutura conformacional da nitrogenase e sua importância funcional

O aprimoramento dos estudos cristalográficos tem garantido um refinamento da resolução para análise das proteínas da nitrogenase, atualmente na faixa de 2,2–3,0 Å (Peters et al., 1997; Rees et al., 1998). Este aumento de resolução tem permitido esclarecer muitas interações da MoFe-proteína com os centros metálicos e durante a formação do complexo da nitrogenase (Peters et al., 1997; Schindelin et al., 1997).

Cada subunidade α da Fe-proteína se dobra como um único domínio do tipo α hélice/folha pregueada (β sheet) e estão covalentemente conectadas pelo agrupamento 4Fe-4S em uma extremidade do dímero (Figura 3). No centro de cada subunidade são encontradas oito regiões do tipo folha pregueada, organizadas paralelamente, as quais estão ladeadas por nove α hélices.



Figura 3 - Esquema da estrutura conformacional do par de subunidades $\alpha\beta$ durante a formação do complexo enzimático Nitrogenase ($\alpha_2\beta_2$). A subunidade α está representada em azul e a β em marron (Kim & Rees, 1994).

Em todas as eubactérias diazotróficas já estudadas, as sequências da Fe proteína apresentam cinco resíduos conservados de cisteína: Cys-39, Cys-86, Cys-98, Cys-133 e Cys-185 (números referentes à sequência de *A. vinelandii*). Estudos com estirpes mutantes revelaram que, desses cinco resíduos, somente os resíduos Cys-98 e Cys-133 de cada subunidade são absolutamente requeridos como ligantes para o agrupamento 4Fe-4S e portanto essenciais para a atividade dos componentes da proteína (Dean & Jacobson, 1992). Além disso, a coordenação simétrica desses quatro ligantes (dois por subunidade) do agrupamento 4Fe-4S resulta na exposição deste agrupamento pelo seu posicionamento entre as duas subunidades da Fe-proteína (Morgan et al., 1990). Esta característica é bastante interessante e sugere que este centro redox deve funcionar como um pivô ou eixo permitindo que rearranjos conformacionais entre as subunidades sejam estabilizados durante o ciclo catalítico da nitrogenase (Kim e Rees, 1995). Uma característica estrutural marcante da Fe-proteína, além da sua semelhança com proteínas ligantes de nucleotídeos, é a presença de uma sequência padrão de resíduos de aminoácidos conhecida como estrutura A de Walker ("Walker's motif A") ou alça de ligação para fosfato (alça P). Esta estrutura é caracterizada por um resíduo de glicina, Gly γ 9) separados por quatro resíduos de aminoácidos não

conservados e Gly-Lys γ 15-Ser (GXXXXGKS) e seu envolvimento com a ligação de nucleotídeos foi confirmada por estudos de mutação dirigida (Robson, 1984; Seefeldt et al., 1992; Seefeldt & Mortenson, 1993). Estudos de mutagênese revelaram que outros resíduos de aminoácidos como Asp 125 (presente na estrutura B de Walker, Asp-X-X-Gly) e Ala 157 também estão envolvidos na ligação de nucleotídeos (Wolle et al., 1992; Gavini & Burgess, 1992). Posteriormente, estudos de mutagênese dirigida e cristalografia de raio X permitiram mapear a região de ligação de nucleotídeos (um por subunidade), a qual está localizada logo abaixo do agrupamento 4Fe-4S na interface entre as duas subunidades α (Seefeldt & Dean, 1997; Schindelin et al., 1997). Duas linhas independentes de evidências cristalográficas reforçam o envolvimento desta região com a ligação de nucleotídeos: i) íons molibdato da solução de cristalização são encontrados associados a resíduos na estrutura A de Walker os quais correspondem à localização de grupos fosfato terminais dos nucleotídeos em outras proteínas (o que pode refletir a habilidade do molibdato servir como análogo estrutural do fosfato) e, ii) foi identificada uma molécula parcialmente ocupada de ADP na estrutura do cristal associada a esta posição. Segundo Howard & Rees (1994), duas moléculas de ADP-AIF_4^- estão ligadas a Fe-proteína em uma orientação onde os grupos fosfatos interagem com a alça P e a porção do nucleosídeo se posiciona para longe da MoFe-proteína. Como no complexo estabilizado ADP-AIF_4^- , descrito por Schindelin et al. (1997), a MoFe-proteína não interage com o nucleotídeo. Seu papel na hidrólise do nucleotídeo deve ser o de estabilizar uma forma intermediária da Fe-proteína quando em associação com o nucleotídeo.

Os sítio de ligação para cada fosfato terminal em cada subunidade estão separados entre si e do agrupamento 4Fe-4S por uma distância de aproximadamente 20 Å. Esta distância sugere que Mg-ATP não se liga diretamente ao agrupamento e que a ligação de Mg-ATP e Mg-ADP é acompanhada de significativa alteração conformacional da proteína bem como de alteração da propriedade do agrupamento (revisado por Orme-johnson, 1985; Yates, 1992).

A conformação da MoFe-proteína (apresentada na Figura 3) revela que em geral as subunidades α e β exibem dobras semelhantes das estruturas secundárias do tipo α hélice e folha pregueada nos três domínios (N-terminal, Central e C-terminal). Em cada uma das subunidades existe uma fenda larga e rasa entre os três

domínios. Apesar da homologia estrutural entre estas subunidades, a presença de resíduos específicos de aminoácidos determina a localização do FeMoco na fenda da subunidade α . O envolvimento do agrupamento P na transferência de elétrons entre o agrupamento 4Fe-4S da Fe-proteína e o FeMoco é facilitado pela sua localização na interface entre as subunidades α e β de cada par. Segundo Schindelin et al. (1997), uma via potencial para transferência de elétrons pode ser traçada entre o agrupamento 4Fe-4S e o agrupamento P, dependente da reorganização da MoFe-proteína. A conexão estrutural entre o agrupamento 4Fe-4S e o sítio do ATP envolve um grande deslocamento do resíduo Gly γ 128 para formar um esqueleto de peptídeo ligado através de ponte de hidrogênio ao AlF_4^- e a reorientação das cadeias laterais de Val γ 130 e Val γ 131. Estas alterações ocorrem na alça formada entre os resíduos Asp γ 129 e Cys γ 132 e diretamente une a região do nucleotídeo com a do agrupamento e a interface da MoFe-proteína. Portanto, parece plausível que a principal conexão entre a hidrólise de ATP e transferência de elétrons é a estabilização da interface entre as subunidades da Fe-proteína garantindo a nova conformação a partir do qual o processo ocorre (Rees et al., 1998).

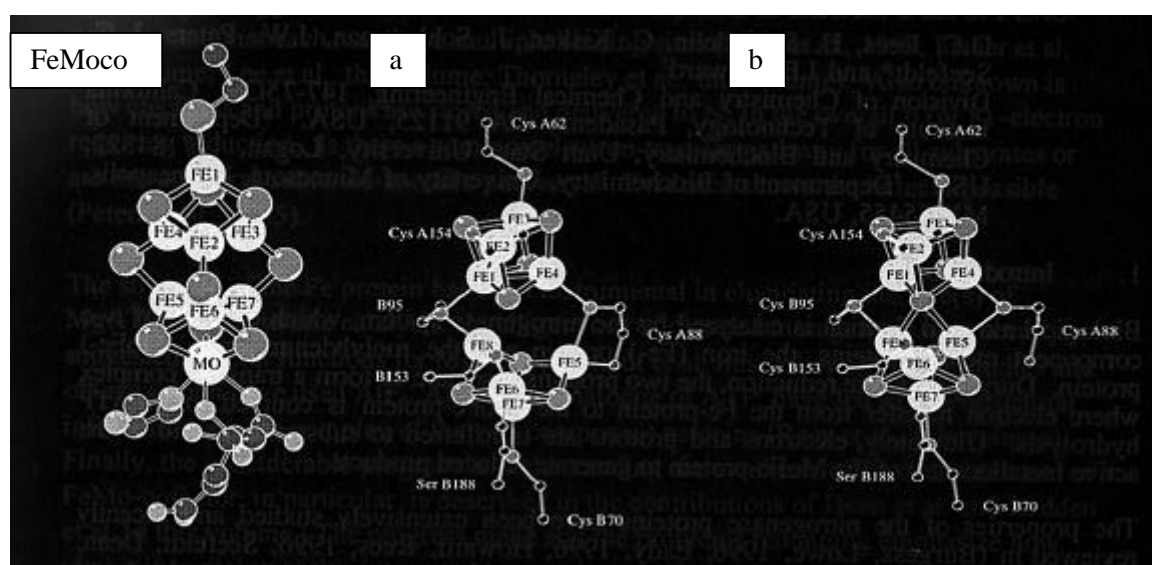


Figura 4 – Esquema do cofator de FeMo e do agrupamento P. Representação da estrutura do agrupamento P no estado oxidado (a) e reduzido (b).

O agrupamento P consiste de dois agrupamentos 4Fe-4S interligado por dois ligantes thiol derivados dos resíduos Cys α 88 e Cys β 95 e uma ponte dissulfeto entre dois enxofres do agrupamento (Figura 4). Esta ligação dissulfeto está

localizada no lado do agrupamento P mais próximo da superfície da proteína, e existem evidências que um dos enxofres envolvidos na ponte é lábil resultando na perda específica de um dos átomos de enxofre envolvido no par do agrupamento P ou de apenas um deles (Chan et al., 1993; Bolin et al., 1993). A relação entre as diferentes formas do par de agrupamentos P, caracterizadas espectroscopicamente ou a partir de formas mecanicamente relevantes, ainda é desconhecida. Além desses ligantes, os 4Fe do agrupamento P também estão ligados, independentemente, através de grupos thiol de outros resíduos Cys, às subunidades α ($\alpha 62$ e $\alpha 154$) e β ($\beta 70$ e $\beta 153$). O agrupamento P é encontrado em um ambiente proteico hidrofóbico graças aos resíduos de aminoácidos presentes: Tyr $\alpha 64$, Pro $\alpha 85$, Tyr $\alpha 91$, Pro $\alpha 155$, Phe $\alpha 186$, Pro $\beta 72$, Phe $\beta 99$, Tyr $\beta 98$, Met $\beta 154$ e Phe $\beta 189$. Além disso, a localização do agrupamento P próximo às extremidades N-terminal de seis hélices ($\alpha 63$ - $\alpha 74$, $\alpha 88$ - $\alpha 92$, $\alpha 155$ - $\alpha 159$, $\beta 71$ - $\beta 81$, $\beta 93$ - $\beta 106$ e $\beta 153$ - $\beta 158$) deve servir como uma contribuição eletrostática para sua estabilidade (Adman et al., 1975). A presença de resíduos de Gly em volta do par de agrupamento P é estruturalmente muito importante para evitar interferência por impedimento estérico, já tendo sido observado fenótipo Nif- associado a substituição do resíduo Gly $\alpha 185$ por Asp (Govenzenski & Zamir, 1989).

O ambiente protéico entre o par de agrupamento P e o FeMoco corresponde a uma distância de 14 Å e não existe nenhuma rede de ligações covalentes ou pontes de hidrogênio entre eles. Este fato sugere que para ocorrer a transferência de elétrons entre eles devem ocorrer alguns “saltos” ou flutuações estruturais/alterações durante a redução do substrato o que permite a formação de vias mais favoráveis para este processo (Wuttke et al., 1992). A composição geral do FeMoco pode ser representada por 1 Mo:7 Fe:9 S:1 homocitrato. Esta estrutura, semelhante a de um centro Heme, desempenha a função de sítio ativo para redução do substrato pela nitrogenase. O FeMoco se encontra localizado no interior de uma fenda, aproximadamente 10 Å abaixo da superfície da MoFe-proteína, que é resultante da conformação adotada pelos três domínios dessa proteína (N-terminal, central e C-terminal) (Kim & Rees, 1992).

O FeMoco se encontra organizado em dois agrupamentos compostos por 4Fe-3S e 1Mo-3Fe-3S, os quais são interligados por três ligantes não-protéicos. De acordo com Kim & Rees (1995) estes três ligantes são parecidos com enxofre

(provavelmente S^{-2}). Foi observado que a densidade de elétrons é semelhante entre as três pontes ligantes na proteína derivada de *C. pasteurianum*, entretanto, quando a proteína analisada foi derivada de *A. vinelandii*, observou-se que o ligante designado Y apresentava menor densidade de elétrons do que a das outras pontes (Bolin et al., 1993; Kim et al., 1993; Chan et al., 1993). Acredita-se que esta menor eletrodensidade do ligante Y seja devido às propriedades dinâmicas ou a heterogeneidade da composição deste sítio. Além dos metais, o homocitrato também é um componente essencial do FeMoco, sendo responsável pela coordenação do Mo através do oxigênio dos seus grupos hidroxila e carboxila. Estudos de cristalografia revelaram que os resíduos de Cys α 275 e His α 442 participam como ligantes direto do FeMoco à subunidade α da MoFe-proteína da nitrogenase, confirmando as evidências derivadas de estudos genéticos (Kim & Rees, 1994; Kent et al., 1990; Dean et al., 1990 Govenzenski & Zamir, 1989). Além disso, o resíduo Ser α 278 é encontrado ligado através de pontes de hidrogênio ao $S\gamma$ do resíduo Cys α 275, estando indiretamente envolvido na coordenação do FeMoco no sítio ativo da nitrogenase.

Formação do complexo e mecanismo de ação da nitrogenase

Segundo Thorneley & Lowe (1985), a formação do complexo enzimático da nitrogenase tem uma contribuição crítica para a cinética geral do processo de fixação de nitrogênio, uma vez que a dissociação desse complexo é a etapa determinante da reação. Apesar da estrutura da nitrogenase não ter sido totalmente estabelecida, alguns aspectos estruturais podem ser propostos com base nas estruturas de seus componentes (Figura 5).

O envolvimento dos resíduos Arg 100 e Glu 112 da Fe-proteína interagem com a MoFe-proteína que por sua vez parece apresentar envolvimento dos resíduos Phe β 125 e Asp α 161 na interação com a Fe-proteína (citado por Kim & Rees, 1994). O modelo proposto para a interação entre a Fe-proteína e MoFe-proteína está representado na figura 5 (Kim & Rees, 1992) e foi gerado a partir do modelo de encaixe onde o eixo de simetria bilateral da Fe-proteína sobrepõe o eixo de simetria que atravessa o par de agrupamento P na interface entre as subunidades α e β da MoFe-proteína. Ainda não foram estabelecidas as consequências estruturais da presença do sítio para ligação de ATP na interface das duas subunidades da Fe-

proteína. Entretanto, acredita-se que durante a hidrólise simultânea ou sequencial de 2 moléculas de Mg-ATP no complexo devem resultar alterações conformacionais, tais como alteração na orientação relativa das várias subunidades, tanto para a Fe quanto para a MoFe-proteína (Howard & Rees, 1994). Um dos efeitos dessas alterações podem ser formas estruturais intermediárias ativadas e competentes da Fe-proteína e a MoFe-proteína para a transferência de elétrons entre elas no complexo.



Figura 5 - Modelo conformacional da Nitrogenase ($\alpha_2\beta_2$). Visão perpendicular ao eixo de simetria bilateral do tetrâmero, subunidades α em azul e subunidades β em marrom (Kim & Rees, 1992).

A distância observada, através de cristalografia, entre os agrupamentos 4Fe-4S para o FeMoco (32 Å) não favorece a transferência direta dos elétrons entre estes centros metálicos da nitrogenase. Considerando o modelo proposto para a estrutura da nitrogenase, é possível deduzir que o agrupamento P participe no processo de transferência de elétrons entre estes centros metálicos. Esta conclusão é razoável, visto que as taxas de transferências de elétrons entre pares de centros redox separados por aproximadamente 15 Å (Wuttke et al., 1992) devem ser mais rápidas do que a etapa determinante da reação da nitrogenase que é de aproximadamente 5 s^{-1} (Hageman & Burris, 1978; Thorneley & Lowe, 1985).

As alterações conformacionais associadas à ligação e hidrólise de ATP podem facilitar a transferência de elétrons através do agrupamento P por pelo menos dois possíveis mecanismos. Estas alterações conformacionais devem, a princípio:

- dirigir a transferência de elétrons a partir da Fe-proteína para o agrupamento P, seguido da transferência destes pelo agrupamento P reduzido para o FeMoco da MoFe-proteína (Chan et al., 1993), ou ;
- dirigir a transferência de elétrons a partir do agrupamento P para o FeMoco, seguido pela transferência de elétrons pela Fe-proteína para o agrupamento P oxidado (Howard & Rees, 1994).

O resultado é que, em ambos os casos, ao fim do ciclo redox, o agrupamento P permanece no mesmo estado de oxidação do início, enquanto que o FeMoco e a Fe-proteína estão, respectivamente, reduzido e oxidada por um elétron. Também é possível que o agrupamento P possa promover uma transferência líquida de elétrons para o FeMoco, especialmente em formas altamente reduzidas da MoFe-proteína. Foram obtidas evidências experimentais da oxidação do agrupamento P associado com a redução do nitrogênio comparáveis à oxidação da hidrazida (2-) o que, segundo Lowe et al. (1993), pode refletir este tipo de comportamento.

Baseado na estrutura do FeMoco, uma grande variedade de possíveis geometrias para ligação de substratos ao cofator, envolvendo um ou mais Fe, Mo e/ou sítios de S, podem ser obtidas. Entre estas, a ligação de substratos aos sítios Fe, trigonalmente coordenados, geram possibilidades intrigantes, visto que estes átomos de Fe estão coordenados de forma insaturada e parecem dispostos de forma a favorecer interação com outros grupos. Dessa forma, Kim et al. (1993) sugerem que três tipos gerais de ligação do substrato aos átomos de Fe coordenados podem ser descritos: a) Substratos podem se ligar a um dos seis Fe centrais, dos três sítios Fe-coordenados, b) três grupos de anéis octacíclicos ocorrem na superfície externa do FeMoco, consistindo de sítios S e Fe alternados, estes arranjos podem criar o equivalente a uma pequena região de superfície de Fe, cada uma contendo 4 átomos de Fe. Substratos poderiam se ligar a estas superfícies de forma a interagir simultaneamente com até quatro átomos de Fe; c) alguns substratos pequenos como N_2 e/ou H^+ (H_2) poderiam ocupar a cavidade

central do FeMoco e dessa forma substituir ligações fracas tipo Fe-Fe pelas ligações Fe-substrato. Neste último modelo, o cofator serve efetivamente como um hospedeiro para o substrato N_2 . Certamente é possível que uma variedade de modos de ligação diferentes são utilizados por intermediários gerados durante a redução do substrato ou também por alguns substratos alternativos. Além disso, Burgess (1985) observou que a presença de sítios múltiplos potenciais para ligação do substrato no FeMoco podem ser relacionados com a complexa cinética de inibição observada entre os vários substratos e ligantes.

Considerando que a redução de todos os substratos conhecidos da nitrogenase dependem de um número par de elétrons, alguns esquemas têm focado a adição de um par de elétrons à molécula de N_2 , levando à sequência formal de redução: N_2 , diimida, hidrazina e amônia. Neste caso, a etapa limitante do processo é a redução de nitrogênio à diimida e uma estratégia para superar esta barreira pode ser a redução do nitrogênio ligado por mais do que dois elétrons, possivelmente, pela doação de elétrons do agrupamento P combinado com elétrons previamente armazenados no FeMoco. O papel do homocitrato na nitrogenase é fundamental, visto a sua coordenação com o Mo e a presença de moléculas de água nas regiões vizinhas. Além disso, ele está posicionado no lado do cofator próximo ao agrupamento P. Estes fatos sugerem que o homocitrato deve participar da transferência de elétrons a partir do agrupamento P para o cofator ou servir como mediador da transferência de prótons para vários intermediários reduzidos. A substituição de homocitrato por outros ácidos orgânicos permitiu estabelecer que o requerimento mínimo para sua atividade funcional é a presença de dois grupos carboxila e um grupo hidroxila (Imperial et al., 1989). Além disso, a estereoquímica do ácido orgânico também influencia profundamente a habilidade deste grupo em suportar a redução de diversos substratos pela nitrogenase (Madden et al., 1990).

Nitrogenases alternativas

Uma característica importante, observada através da sequência de nucleotídeos, das nitrogenases alternativas é a conservação dos resíduos de aminoácidos que ligam os centros metálicos nessas proteínas. Geralmente, acredita-se que as proteínas das nitrogenases alternativas apresentam grande semelhança com as proteínas da nitrogenase clássica, ocorrendo apenas a substituição do Mo

por V ou Fe na composição de seus cofatores (FeV-co e FeFe-co). A estrutura dos cofatores das nitrogenases Mo – independentes ainda não foi totalmente determinada, porém existem fortes evidências da semelhança estrutural entre o FeVco e FeFeco com o cofator de FeMo. Ludden et al. (1998) se baseia no fato de que os FeVco e FeFeco isolados são capazes de substituir o FeMoco de proteínas da nitrogenase codificada por genes *nif*. Recentes estudos sobre a estrutura dos cofatores de FeV e FeFe revelam homologia entre seu centro metálico e o observado para o FeMoco (revisado por Eady, 1996; Krahn et al., 1998). Entretanto, tem sido observado que preparações de VFe-proteínas apresentam menor conteúdo de Fe do que o observado para as MoFe-proteínas (Eady, 1991; Bishop & Premakumar, 1992).

A aparente substituição de Mo por V ou Fe sugere que Mo não indispensável para a redução do nitrogênio. Entretanto, o fato de que estas substituições apresentam influência direta na especificidade dessas nitrogenases pelos substratos indica que estes metais não atuam passivamente na reação (Richards, 1998; Dröttboom et al., 1998). Dentre as possibilidades de ação do Mo está o fato dele poder interagir com o substrato (N_2) e outros ligantes, através do número de coordenação ou pelo deslocamento de um ligante existente. Segundo Leigh & Jimenez-Tenorio (1991), neste caso, a ligação do N_2 e outros substrato/intermediários ao Mo deve ser um pré-requisito para a redução do substrato ou deve representar uma etapa intermediária na transferência do N_2 para o Fe. Outra possibilidade, caso não ocorra um envolvimento direto na ligação do substrato ou intermediários, é que Mo/V atuem como moduladores do potencial redutor necessário para a ligação e redução do N_2 , participem na transferência de elétrons entre o agrupamento P e o FeMoco, e/ou desempenhe papel estrutural que favoreça a orientação apropriada entre o cofator, o homocitrato e a proteína.

2. Considerações finais

Os avanços no conhecimento da estrutura da nitrogenase são essenciais para a elucidação do mecanismo da reação de transformação de nitrogênio a amônia. Estes avanços, além de elucidar a conformação dos componentes da nitrogenase, têm permitido esclarecer pontos obscuros da arquitetura do cofator de FeMo da

MoFe-proteína, a coordenação entre os centros metálicos e seus ligantes e as interações entre estes componentes estruturais da nitrogenase.

Um exemplo da importância desses estudos para a compreensão do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e seus fatores limitantes é a disposição dos centros metálicos nos componentes da nitrogenase. A exposição dos centros metálicos na superfície das Fe-proteína e MoFe-proteína apesar de favorecer a transferência de elétrons entre estes componentes da nitrogenase também pode explicar a sua extrema sensibilidade ao oxigênio. Microrganismos diazotróficos capazes de fixarem N_2 em condições microaeróbicas, como por exemplo *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, perdem a atividade da nitrogenase de forma irreversível quando expostos a concentrações de oxigênio inibitórias. Neste caso, é necessário a síntese *de novo* dessa enzima para restabelecer o processo quando as condições de fixação de N_2 voltem a ser propícias. Este efeito drástico sugere que através da interação direta, o oxigênio influencie a conformação da nitrogenase e/ou o potencial redutor dos seus centros metálicos, causando danos irreversíveis para o complexo. Uma forte evidência deste fato é o requerimento de condições anaeróbicas ou antioxidantes, durante o isolamento dos componentes da nitrogenase, na sua forma nativa capaz de reassociar *in vitro* e realizar o processo de redução do N_2 na presença de agentes redutores como o ditionito.

De uma forma geral, a ciência é um processo contínuo e progressivo de captação de informações. Ao mesmo tempo que certas hipóteses são testadas e comprovadas, novas questões surgem e aguardam que provas experimentais as expliquem. Qual é o mecanismo que envolve a transferência de elétrons entre as proteínas e o substrato da reação? Qual é o papel do Mo/V ou Fe na estrutura do sítio ativo dessas nitrogenase? Será que estes componentes são os responsáveis pela diferença de especificidade entre as nitrogenases conhecidas?

Estas questões intrigantes formarão a nova base conceitual para o avanço do conhecimento nos próximos anos. Através de suas respostas, certamente, é que pesquisadores nesta área irão direcionar a evolução da compreensão dos processos de bases químicas e bioquímicas que regem a FBN.

3. Referências Bibliográficas

- ADMAN, E.T.; WATENPAUGH, K.D.; JENSEN, L.H. NH-S hydrogen bounds in *Peptococcus aerogenes* ferredoxin, *Clostridium pasteurianum* rubredoxin and chromatium high potential iron protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.72, p.4854-4858, 1975.
- BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R. 1992. Alternative nitrogen fixation systems. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.736-762.
- BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M.L.; HETHERINGTON, D.R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.150, n.3, p.1244-1251, 1980.
- BOLIN, J.T.; CAMPOBASSO, N.; MUCHMORE, S.W., MINOR, W.; MORGAN, T.V.; MORTENSON, L.E. The crystal structure of the nitrogenase MoFe protein from *Clostridium pasteurianum*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. eds. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.89-94.
- BORTELS, H. Weitere unthersuchungen uber die bedeutung von molybdan, vanadium,wolfram und anderen erdasenstoffen fur stickstoffbindende und andere mikroorganismen. **Zentralblatt Bakteriologie, Parasitenkunde AbtII**, Stuttgart, v.95, p.193-218, 1932.
- BULEN, W.A.; LECOMTE, J.R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two enzyme requeriments for N₂ reduction, ATP dependent H₂ evolution and ATP hydrolysis . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.56, p.979-986, 1966.
- BURGESS, B.K. Structure and reactivity of nitrogenase – na overview. In: VEEGER, C.; NEWTON, W.E. eds. **Advances in Nitrogen Fixation Research**. The Hague: Martinus Nijhoff, 1984. p.103-114. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Fixation, 1983.

- BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants.** New York: Springer-Verlag, 1975. 189p.
- CHAN, M.K.; KIM, J.; REES, D.C. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2,2Å resolution structures. **Science**, Washington, v.260, p.792-794, 1993.
- CHISNELL, J.R.; PREMAKUMAR, R.; BISHOP, P.E. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, n.1, p.27-33, 1988.
- DAVIS, R., LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n.5, p.1445-1450, 1996.
- DEAN, D.R. & JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.763-834.
- DEAN, D.R.; SETTERQUIST, R.A.; BRIGLE, K.E.; SCOTT, D.J.; LAIRD, N.F.; NEWTON, W.E. Evidence that conserved residues Cys-62 and Cys-154 within the *Azotobacter vinelandii* nitrogenase MoFe-protein alpha-subunit are essential for nitrogenase activity but conserved residues His-83 and Cys-88 are not. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.4, n.1505-1512, 1990.
- DRÖTTBOOM, M.; SCHNEIDER, K.; MULLER, A. 1998. The Fe-only nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: Catalytic and EPR-spectroscopic properties of the FeFe-protein. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.57-58. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, 1997.
- EADY, R.R.; SMITH, B.E. 1979. Physicochemical properties of nitrogenase and its components. In: HARDY, R.W.F. et al. eds. **A treatise on dinitrogen fixation**, New York: Chapman & Hall, 1979. p.399-490.

- EADY, R.R. 1991. The Mo⁻, V⁻ and Fe⁻ based nitrogenase systems of *Azotobacter*. *Adv. Inorg. Chem.*, 36:77-102.
- EADY, R.R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, Washington, v.96, p.3013-3030, 1996.
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.
- GAVINI, N. & BURGESS, B.K. FeMo cofactor synthesis by *nifH* mutant with altered MgATP reactivity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.267, p.21179-21186, 1992.
- GOVEZENSKI, D.; ZAMIR, A. Structure function relationship in the subunit of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase MoFe protein from analysis of *nifD* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.5729-5735, 1989.
- HAGEMAN, R.V.; BURRIS, R.H. Kinetics studies on electron transfer and interaction between nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii* nitrogen fixation. **Biochemistry**, New York, v.17, p.4117-4124, 1978.
- HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase: A nucleotide-dependent molecular switch. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.63, p.235-264, 1994.
- IMPERIAL, J.; HOOVER, T.R.; MADDEN, M.S.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. Substrate reduction properties of dinitrogenase activated in vitro are dependent upon the presence of homocitrate or its analogues during iron-molybdenum cofactor synthesis. **Biochemistry**, New York, v.28, p.7796-7799, 1989.
- KENNEDY, C.; EADY, R.R.; KONDOROSI, E.; REKOSH, D.K. The Molybdenum-Iron Protein of *Klebsiella pneumoniae* Nitrogenase: Evidence for non-identical subunits from peptide mapping. **Biochemical Journal**, Colchester, v.155, p.383-389, 1976.

- KENT, H.M.; BAINES, M.; GORMAL, C.; SMITH, B.E.; BUCK, M. Analysis of site-directed mutations in the α and β subunits of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.4, p.1497-1504, 1990.
- KIM, J.; REES, D.C. Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenasemolybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Nature**, London, v.360, p.553-560, 1992.
- KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**, New York, v.33, p.389-397, 1994.
- KIM, J.; WOO, D.; REES, D.C. X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum iron protein from *clostridium pasteurianum* at 3.0 Å resolution. **Biochemistry**, New York, v.32, p.7104-7115, 1993.
- KRHAN, E.; WEISS, B.J.R.; KRÖCKEL, M.; CRAMER, S.P.; TRAUTWEIN, A.X.; SCHNEIDER, K.; MULLER, A. The Fe-only nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: The FeFe-protein metal centers probed by EXAFS and Mössbauer spectroscopy. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.59-60. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, 1997.
- LEIGH, G. J.; JIMENEZ-TENORIO, M. Exchange of dinitrogen between iron and molybdenum centers and the reduction of dinitrogen bound to iron: implications for the chemistry of nitrogenases. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:5862-5863, 1991.
- LOWE, D.J.; POSTGATE, J.R.; THORNELEY, R.N.F. 1985. Biochemical constraints of biological nitrogen fixation. In: Mallik, K.A. et al. (Eds.) *Nitrogen and the Environment*. Faisalabad (Pakistan), Nuclear Institut for Agriculture and Biology. p.73-91.
- LOWE, D.J.; FISHER, K.; THORNELEY, R.N.F. *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase: pre-steady state absorbance changes show that redox changes occur in the MoFe protein that depend on substrate and component proteins ratio, a role for P-centers in reducing dinitrogen. **Biochemical Journal**, Colchester, v.292, p.93-98, 1993.

- LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; RÜTTIMAN-JOHNSON, C.; RANGARAJ, P.; FOULGER, T.; ALLEN, R.M.; HOMER, M.; ROLL, J.; ZHANG, X.; CHATTERJEE, R. Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.33-38. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, 1997.
- MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.29, p.1599-1602, 1996.
- MADDEN, M.S.; KINDON, N.D.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. Diastereomer-dependent substrate reduction properties of a dinitrogenase containing 1-fluorohomocitrate into the iron-molybdenum cofactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.6517-6521, 1990.
- MORGAN, T.V.; McCRAKEN, J.; ORME-JOHNSON, W.H.; MIMS, W.B.; MORTENSON, L.E.; PEISACH, J. Pulsed electron paramagnetic resonance studies of the interaction of MgATP and D₂O with the iron protein of nitrogenase. **Biochemistry**, New York, v.29, p.3077-82, 1990.
- ORME-JOHNSON, W.H.A. 1985. Molecular basis of biological nitrogen fixation. *Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 14:419-459.
- PETERS, J.W.; STOWELL, M.H.B.; SOLTIS, S.M.; EINNEGAN, M.G.; JOHNSON, M.K.; REES, D.C. Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. **Biochemistry**, New York, v.36, p.1181-1187, 1997.
- PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. 2.ed. Dubuque: Wm. C.Brown, 1993. 911p.

- REES, D.C., SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHLESSMAN, J.; PETERS, J.W.; SEEFELDT, L.C.; HOWARD, J.B. Complex structure of nitrogenase. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.33-38. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, 1997.
- RICHARDS, R.L. Chemical models for the function of nitrogenase. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.17-22. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, 1997.
- ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Second gene (*nifH**) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein, EMBO. J. v.5, p.1159-1163, 1986.
- SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHLESSMAN, J.L.; HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structure of ADP- AlF_4^- stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, London. v.387, p.370-376, 1997.
- SEEFELDT, L.C.; DEAN, D.R. Role of nucleotides in nitrogenase catalysis. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v.30, p.260-266, 1997.
- SEEFELDT, L.C. & MORTERSON, L.E. 1993. Increasing nitrogenase catalytic efficiency for MgATP by changing serine of its Fe protein to threonine: use of Mn^{2+} to show interaction of serine 16 with Mg^{2+} . *Protein Sci.*, 2:93-102.
- SEVILLA, M.; MELETZUS, D.; TEIXEIRA, K.; LEE, S.; MUTAKKI, A.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, p.871-874, 1997.
- SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science*, Washington, v.224, p.1095-1097, 1984.
- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms; pure and applied aspects**. London: Chapman and Hall, 1990. 256p.

- TEIXEIRA, K.R. dos S. **Bases moleculares e genética da Fixação Biológica de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, out. 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32)
- THORNELEY, R.N.F.; LOWE, D.J. Kinetics and mechanism of nitrogenase enzyme system. In: SPIRO, T.G. ed. **Molybdenum enzymes**. New York: Willey & Sons. 1985. p. 221-284.
- WOLLE, D.; DEAN, D.R.; HOWARD, J.B. Nucleotide iron-sulphur cluster signal transduction in the nitrogenase iron-protein: the role of Asp 125. **Science**, Washington, v.258, p.992-995, 1992.
- WUTTKE, D.S.; BJERRUM, M.J.; WINKLER, J.R.; GRAY, H.B. Electron-tunneling pathways in cytochrome-C. **Science**, Washington, v.256, p.1007-1009, 1992.
- YATES, M.G. 1992. The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p.685-735.
- ZINONI, F.; ROBSON, M.; ROBSON, R.L. Organization of potential alternativa nitrogenase genes from *Clostridium pasteurianum*. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, n.1174, p.83-86, 1993.